

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**NUKLEOMORF I KOMPLEKSNI PLASTIDI**

**NUCLEOMORPH AND COMPLEX PLASTIDS**

**SEMINARSKI RAD**

Maša Lenuzzi

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Goran Kovačević

Zagreb, 2011.

# SADRŽAJ:

1. UVOD .....	1
2. TRANSFER GENA IZME U ENDOSIMBIONTA I DOMA INA .....	3
3. ALGE RODOVA <i>Cryptophyta</i> i <i>Chlorarachniophyta</i> KAO ŽIVU I DOKAZI TEORIJE O SEKUNDARNOJ ENDOSIMBIOZI.....	4
4. SEKUNDARNA ENDOSIMBIOZA U VRSTA KOJE SU IZGUBILE NUKLEOMORF..	6
4.1. CHROMALVEOLATNA HIPOTEZA.....	7
4.2. KRIPTI NI PLASTIDI I MITOHONDRIJI .....	8
4.2.1. HIDROGENOSOMI .....	8
4.2.2. MITOSOMI.....	9
4.3. KOMPLEKSNI PLASTIDI OKRUŽENI S TRI MEMBRANE .....	9
4.3.1. KOMPLEKSNI PLASTID OKRUŽEN S TRI MEMBRANE UNUTAR VRSTE <i>Euglena gracilis</i> .....	9
4.4. KOMPLEKSNI PLASTIDI OKRUŽENI S ETIRI MEMBRANE.....	10
5. TRANSPORT PROTEINA KROZ MEMBRANE KOMPLEKSNIH PLASTIDA .....	11
5.1. TRANSPORT U KOMPLEKSNE PLASTIDE OKRUŽENE S ETIRI MEMBRANE .....	12
5.2. TRANSPORT U KOMPLEKSNE PLASTIDE OKRUŽENE S TRI MEMBRANE...	12
6. ZAKLJU AK .....	14
7. LITERATURA.....	15
8. POPIS KRATICA .....	20
9. SAŽETAK.....	21
10. SUMMARY .....	22

# 1. UVOD

Me uovisnost i me udjelovanje vrsta temelj je biološke raznolikosti. Razina me uovisnosti izme u vrsta može biti neznatna ili isključivo prehrambena, a može sezati sve do obligatorne simbioze mutualisti kog ili parazitskog tipa.

Teoriju o endosimbiotskom podrijetlu plastida predložio je 1885. godine njemački botanik Andreas Franz Wilhelm Schimper (1856.-1901.). On je pretpostavio kako su kloroplasti podrijetlom fotosintetske bakterije koje su ušle u eukariotsku stanicu. Njegovu teoriju 1905. obnovio je ruski biolog Konstantin Sergejewitsch Merschkowski, inače specijalist za lišajeve (Chapman i sur., 2006). Danas se smatra kako je predak mitohondrija bio mikrob nalik  $\alpha$ -proteobakteriji koji je prije otprilike 1,5 milijardi godina ušao u stanicu domaćina, dok kloroplast potječe od cijanobakterije koja je ušla u stanicu nakon ulaska pretka mitohondrija<sup>1</sup> (Cavalier-Smith, 2006). Alternativna teorija predlaže da su kloroplast i mitohondrij zajedno uneseni u eukariotsku stanicu kao fotosintetski prokariot. Međutim, zbog puno veće kompleksnosti plastidnog genoma u usporedbi s genomom mitohondrija<sup>2</sup>, ta je teorija uglavnom odbačena. Također, s ekološkog gledišta, kisik je otrovan za stanicu koja ne sadrži mitohondrij (Rizzotti, 2000).

Danas postoje tri hipoteze koje objašnjavaju ulazak bakterijskog pretka organela u stanicu domaćina. Jedna pretpostavlja kako je eukariotski domaćin progutao bakteriju, ali ju nije uspio razgraditi. Druga smatra kako je bakterija ušla u eukariotsku stanicu kao patogen dok treća tvrdi kako je između bakterije i domaćina u samom početku uspostavljena simbioza.

Razlikujemo primarnu i sekundarnu endosimbiozu. Primarna endosimbioza podrazumjeva ulazak bakterijskog endosimbionta u eukariotskog domaćina i nastanak organela s dvije membrane<sup>3</sup>. Endosimbiont u domaćinu najprije gubi vanjsku membranu i staničnu stijenku. Pri nastanku plastida iz cijanobakterija, iz njezine unutrašnje membrane odvojili su se nabori koji su međusobno povezali i tako stvorili lamele koje dijelimo na tilakoidne i stromalne. Tilakoidne lamele na krajevima razvijaju vezikule te se nakupljaju u strukture zvane grane koje su međusobno povezane sa stromalnim lamelama. Sličan proces se može zamijetiti i kod nekih slobodnoživućih cijanobakterija.

Ulaskom pretka plastida u eukariotsku stanicu dolazi do debeljanja stanične stijenke eukariota. Takva stijenka sprema fagocitnu aktivnost domaćina čime do tada heterotrofni

---

<sup>1</sup> pretpostavlja se, također prije otprilike 1,5 milijardi godina

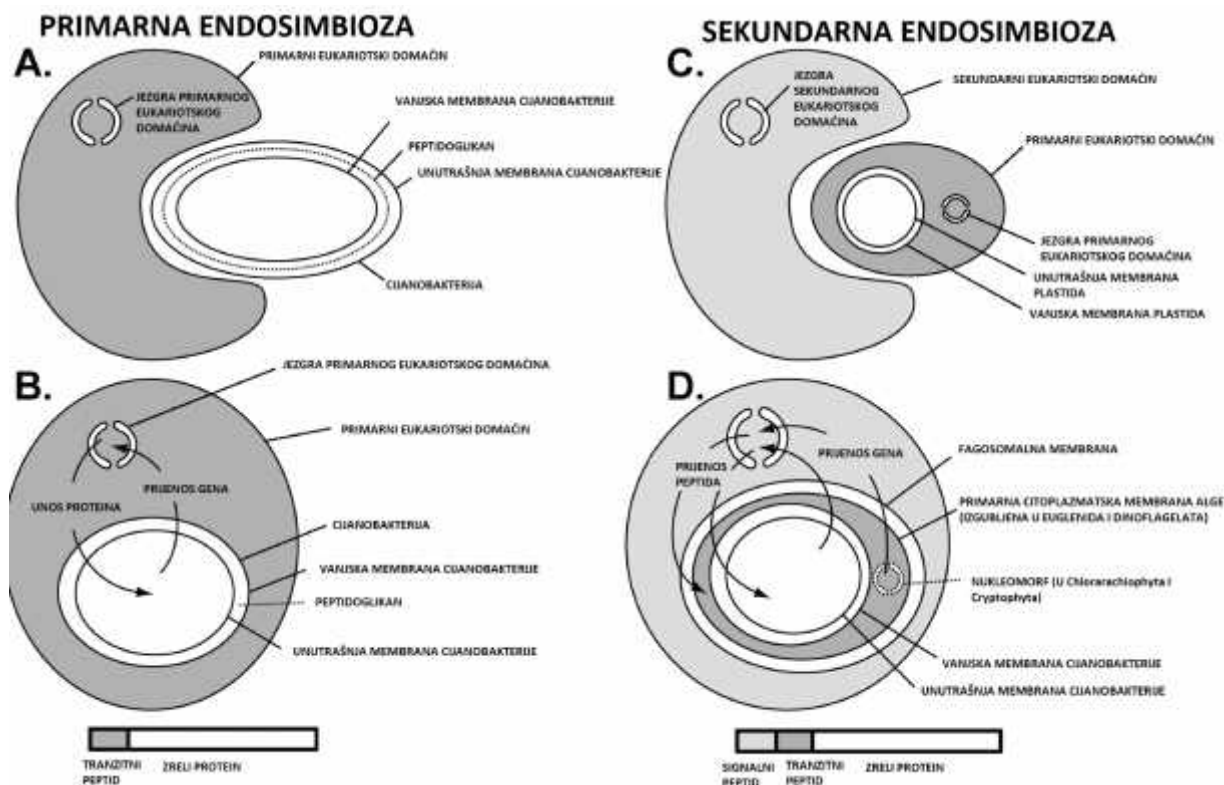
<sup>2</sup> što nalaže kraće vrijeme u kojem je došlo do redukcije genoma organela

<sup>3</sup> jednom vlastitom i jednom domaćinu, to nije njegovog endosoma

eukariot postaje u potpunosti autotrofan (Rizzotti, 2000). Kloroplaste nastale primarnom endosimbiozom nalazimo danas u nižim i višim biljkama te u algama skupina Chlorophyta, Rhodophyta i Glaucocystopyta.

Sekundarna endosimbioza objašnjava nastanak plastida okruženih s više od dvije membrane i obuhvaća ulazak eukariotske stanice koja nosi plastid ili mitohondrij u drugu eukariotsku stanicu. Plastide nastale sekundarnom endosimbiozom nazivamo kompleksni plastidi. Jezgra endosimbionta koja tijekom vremena prolazi kroz procese redukcije svog genetičkog materijala naziva se nukleomorf (Sl. 1.).

Postoje dvije niše koje bakterije zauzimaju unutar eukariotskog domaćina te ih po tome dijelimo na intrafagosomalne i intracitoplazmatske. Intrafagosomalni patogeni su npr. *Afpia*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Coxiella*, *Legionella*, *Mycobacterium*, *Salmonella* i *Rhodococcus* dok su intracitoplazmatski patogeni npr. *Listeria*, *Rickettsia* i *Shigella*. Patogeni u simbiozi gube sve gene odgovorne za njihovu virulenciju te receptore za njihovo prepoznavanje od strane domaćina (Wernegreen, 2005).



Slika 1: Primarna i sekundarna endosimbioza (prilagođeno prema Keeling, 2004)

## 2. TRANSFER GENA IZME U ENDOSIMBIONTA I DOMA INA

Tijekom primarne endosimbioze dolazi do prijenosa gena budućeg plastida u jezgru domaćina<sup>4</sup> te se na taj način smanjuje količina gena u organelu. Organel tako s vremenom postaje ovisan o domaćinu jer gubi većinu gena odgovornih za njegov autonoman metabolizam. U slučaju mitohondrija dolazi do međusobne izmjene genetičkog materijala s domaćinom. Genom domaćina vrši selekciju nad primljenim genima te izbacuje one koji nisu potrebni za održavanje novostepenih organela.

U nešto složenijem obliku, sličan proces uočen je i kod sekundarne simbioze jer osim genoma organela u sekundarnoj simbiozi postoji i genom endosimbiontskog eukariota koji također prenosi svoje gene u jezgru domaćina. Eukariotski simbiot tako reducira svoj genom u manju strukturu od izvorne jezgre nazvanu nukleomorf. Tokom sekundarne simbioze dolazi do prijenosa gena plastida simbionta u nukleomorf te u jezgru i mitohondrij domaćina<sup>4</sup> kao i prijenosa gena nukleomorfa simbionta u jezgru domaćina. Također, dolazi do razmjene gena između mitohondrija i jezgre domaćina.

Dokaz za prijenos gena između kloroplasta i eukariotskog domaćina nalazi se u biljci *Arabidopsis thaliana*. Naime, 18% njenog genoma čine geni cijanobakterijskog podrijetla, na kromosomu 2 sadrži gen dug 367kb podrijetlom iz mitohondrija s kojim se genomskom sekvencom poklapa 99%. Sljedeći dokaz nalazi se u vrsti *Oryza sativa*. Na kromosomu 10 nalazi se NUPT od 33kb koji se 99,7% podudara s izvornim genom kloroplasta. NUPTs vrste *O. sativa* i *A. thaliana* organizirani su u klastere (Lester i Richly, 2004).

Koliko gena plastid sadrži ovisi o organizmu u kojem se nalazi. Npr. nefotosintetski plazmidi vrste *Plasmodium* sadrže dvadesetak kodirajućih gena, funkcionalni kloroplasti viših biljaka kodiraju 60-80 funkcionalnih proteina dok rod *Porphyra* kodira za njih dvjestotinjak. Za usporedbu, genom cijanobakterije kodira 3168 proteina (Martin i sur., 1998, 2002).

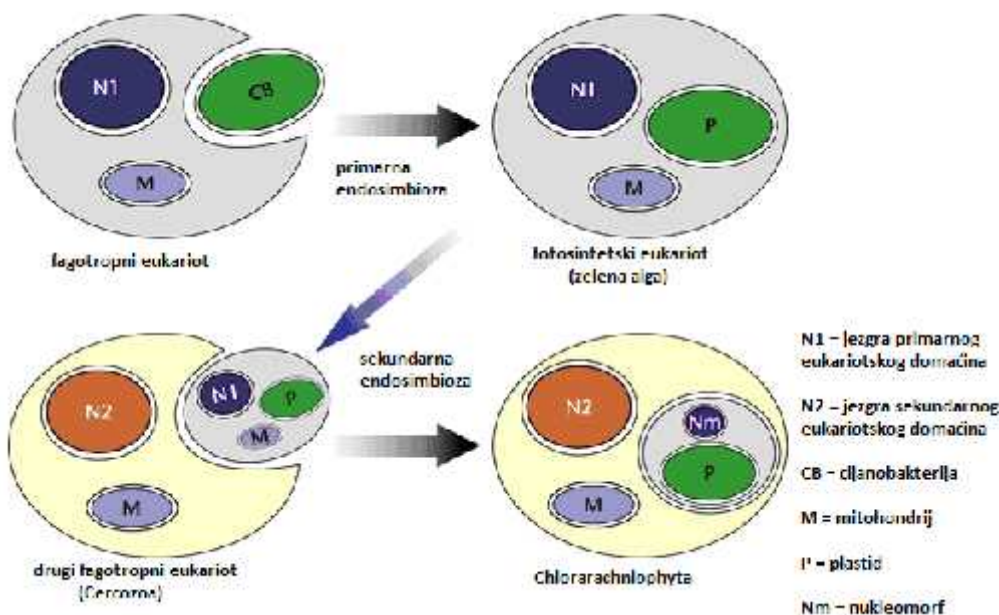
Nameće se pitanje zašto nisu svi geni plastida prešli u jezgru. Pretpostavlja se kako je za to odgovorna stalna potreba za održavanjem ravnoteže potencijala između membrana pomoću proteina koje kodira genom plastida. Čak i male promjene u preraspodjeli naboja mogu biti kobne za stanicu. Zato proteini koji sudjeluju u tom putu moraju biti uvijek sintetizirani u pravo vrijeme na pravom mjestu kako bi mogli interagirati s elektronom i/ili drugim proteinima (Race i sur., 1999).

---

<sup>4</sup>obrnut proces nije potvrđen

### 3. ALGE RODOVA *Cryptophyta* i *Chlorarachniophyta* KAO ŽIVU I DOKAZI TEORIJE O SEKUNDARNOJ ENDOSIMBIOZI

Alge skupina *Cryptophyta* i *Chlorarachniophyta* predstavljaju bitne dokaze koji potvrđuju teoriju o sekundarnoj simbiozi kao evolucijskom imbeniku u razvoju eukariota. Naime, one još uvijek sadržavaju dio jezgre eukariotskog simbionta, tzv. nukleomorf (Sl. 2.). On se nalazi između druge i treće membrane plastida u reduciranoj citoplazmi eukariotskog simbionta koja ne sadrži nikakve druge organele niti endoplazmatski retikulum (Whatley i sur., 1979), no sadrži 80S ribosomske podjedinice. Takva citoplazma se naziva periplastidni odjel (McFadden i sur., 1997).



Slika 2: Sekundarna endosimbioza u *Chlorarachniophyta* (prilagođeno prema Ishida i Ota, 2008)

Nakon prijenosa gena iz nukleomorfa u jezgru nije slučaj. Najprije se prebacuju geni odgovorni za primarni metabolizam te geni vezani uz strukturne komponente fotosintetskog aparata (Dunford i sur., 1999). Smatra se kako bi nakon izvjesnog vremena nukleomorf skupina *Chlorarachniophyta* i *Cryptophyta* trebao predati sav svoj genetički materijal jezgri domaćina. Postoji i alternativna hipoteza koja pretpostavlja da je uspostavljena ravnopravna simbioza između domaćina i nositelja nukleomorfa te da do njegove redukcije neće doći jer za to nema potrebe.

Eksperimenti su 1980-ih dokazali da nukleomorf *Cryptophyta* sadrži DNA i RNA (Ludwig i Gibbs, 1985). Istraživanja su pokazala kako se nukleomorfi *Cryptophyta* i *Chlorarachniophyta* sastoje od tri kromosoma (Eschbach i Hansmann, 1990). Svi analizirani nukleomorfi su mali, veličine od 95 do 225kb (Rensing i sur., 1994) što ih čini zasada najmanjim poznatim genomima u prirodi. Istraživanja filogenetskog podrijetla 18S rRNA gena pokazala su kako je simbiot *Cryptophyta* srodan crvenim algama, dok su simbionti *Chlorarachniophyta* srodni zelenim algama (van de Peer i sur., 1996).

Genom nukleomorfa *Cryptophyta*, kao i onaj *Chlorarachniophyta*, bogat je A+T sljedovima koji čine otprilike 75% njihovih kodirajućih regija te čak do 95% nekodirajućih regija (Gilson i McFadden, 1996, Zauner i sur., 2000). Još nije točno poznat razlog koji je do toga doveo, no poznato je kako su takvi sljedovi uobičajeni u nekim parazitskim (Andersson i sur., 1998) i simbiotskim interakcijama. Također, oni su u semiautonomnim organelima kao što su mitohondriji i plastidi, što je dobro proučeno u parazitskoj vrsti *Plasmodium falciparum* (Gardner i sur., 1998).

Kod *Chlorarachniophyta* geni nukleomorfa bogati su malenim spliceosomalnim intronima veličine 18-20pb (Gilson i McFadden, 1996) dok su u nukleomorfima *Cryptophyta* introni rjeđi, ali veći, i iznose 42-55pb što je možda posljedica različitog podrijetla nukleomorfa<sup>5</sup>. Takvo očuvanje intronskih sekvenci upućuje na to da određeni introni nisu samo otpadna DNA kakvom su se do nedavno smatrali. Oni imaju svoju funkciju u genomu koja je najvjerojatnije u vezi s regulacijom ekspresije gena jer bi najvjerojatnije već bila iščezla pod selekcijskim pritiskom koji je u nukleomorfima izbrisao gotovo svu nekodirajuću DNA.

Proučeno je nekoliko proteina koje kodira genom nukleomorfa. U tu skupinu ubrajamo proteine za ekspresiju i održavanje nukleomornog genoma<sup>6</sup> kao i proteine jezgre, chaperonine, proteine za 26S proteosom, proteine citoskeleta i signalne faktore, no nisu pronađeni geni za enzime koji su uključeni u primarni metabolizam. Također, prisutnost histona, tubulina i centrosomalnih gena u nukleomorfu roda *Guillardia* upućuje na to da on ima primitivnu mitotsku diobu iako do sad nisu detektirani mikrotubuli (Zauner i sur., 2000). Nukleomorf vrste *Bigeloviella natans* predao je u jezgru domaćina gene za DNA polimerazu te histone H2A i H2B dok je zadržao one za H3 i H4 histone.

---

<sup>5</sup> crvene alge imaju genom siromašan intronima kao i nukleomorf *Cryptophyta*, dok su zelene alge bogatije intronima kao i nukleomorf *Chlorarachniophyta* (Zauner i sur., 2000)

<sup>6</sup> proteini zaduženi za replikaciju, transkripciju, procesiranje RNA i translaciju

## 4. SEKUNDARNA ENDOSIMBIOZA U VRSTA KOJE SU IZGUBILE NUKLEOMORF

Nakon što preda sav svoj geneti ki materijal jezgri doma ina nukleomorf nestaje i ostaje samo plastid endosimbionta okružen s tri ili etiri membrane. Takav plastid nazivamo kompleksnim plastidom. U razredu Euglenophyceae i ve ini razreda Dinophyceae plastid je kona no okružen s tri membrane. U diviziji Chrystophyceae ili Heterokontophyta, koljenu Cryptophyta te razredima Haptophyceae i Chlorarachniophyta plastid je okružen s etiri membrane. Mogu e je da su neki plastidi rezultat tercijarne endosimbioze u kojoj su se spojile tri eukariotske stanice. Doma in u tercijarnoj simbiozi redovito je bi asta stanica kao npr. dinoflagelati koje sadrže fukoksantin (Jeffrey i Vesk, 1976). Dinoflagelati su skupina koja lako prima i otpušta simbiote te tako er sudjeluje i u kvartarnoj endosimbiozi.

Endosimbionti odjela Euglenophyta i razreda Chlorarachniophyceae, koji se ubrajaju u skupinu Cabozoa, su zelene alge. U diviziji Heterokontophyta te razredima Haptophyceae i Cryptophyceae, koji se ubraju u skupinu Chromista, endosimbionti su crvene alge. Crvene alge tako er su simbionti razreda Dinophyceae i koljena Apicomplexa, koji se ubrajaju u skupinu Alveolata (Cavalier-Smith, 2000, 2002, 2003). Skupne Cabozoa, Chromista i Alveolata ine umjetni takson, jer sadrže polifileti ke skupine iji me uodnosi u to vrijeme nisu bili jasni (nisu razjašnjeni niti danas do kraja), a predložio ih je Cavalier-Smith. Skupina Cabozoa objedinjuje supergrupe Rhizaria i Excavata (<http://www.encyclo.co.uk/define/Cabozoa>). Chromista obuhva a, kako je ve spomenuto, diviziju Heterokontophyta te razrede Haptophyceae i Cryptophyceae no smatra se kako bi razred Haptophyceae trebalo izbaciti iz skupine zbog zna ajnih razlika prema ostalim lanovima (<http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/chromistasy.html>). Supergrupu Alveolata predstavljaju koljena Ciliophora, Apicomplexa i Dinoflagellata (<https://wikispaces.psu.edu/display/110Master/Protists+I+-+Kingdoms+Archaezoa,+Euglenozoa,+Alveolata,+and+Slime+Molds>).

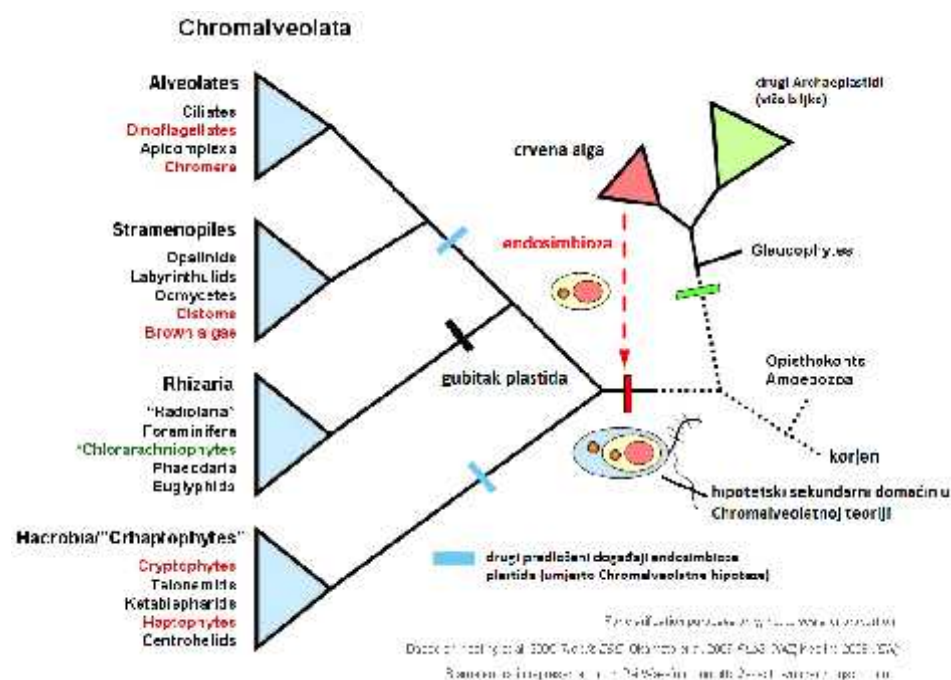


## 4.1. CHROMALVEOLATNA HIPOTEZA

Chromalveolatna hipoteza predlaže da četiri linije protista (Cryptophyceae, Heterokontophyta, Haptophyceae i Alveolata) ine monofileti ku superskupinu nazvanu Chromalveolata koja je definirana jednokratnom sekundarnom endosimbiozom između pretka superskupine i endosimbiontske crvene alge, pripadnika divizije Rhodophyta. Ključni korolar ove hipoteze je da su plastidi nezavisno izgubljeni u više navrata u pojedinim skupinama unutar superskupine Chromalveola (Sl. 3.).

Chromalveolatnu hipotezu razvio je Cavalier-Smith te ju je bazirao na broju i tipovima membrana koje su okruživale plastid te na posjedovanju klorofila *c*. Zaključio je kako su skupine Haptophyta i Heterokontophyta sestrinske linije te ih je uvrstio u zajedničku skupinu pod nazivom Chromobiontes koju je zatim zajedno s koljenom Cryptophyta grupirao u skupinu Chromophytes te konačno Chromophytes postavio supergrupu Alveolata kao sestrinsku skupinu. Jedan od glavnih motiva za izradu takve hipoteze je pokušaj smanjenja broja endosimbiontskih događaja koji su vodili nastanku plastida što bi dovelo do elegantnije sistematike (Cavalier-Smith, 1999, 2003).

Iako je ta teorija postala prilično popularna te postoje istraživanja koja je djelomično podupiru, postoji sve više argumenata koji joj kontriraju, a upitne su i neke ideje koje su korijen te hipoteze. Npr. studije koje su koristile citosolne jezgrine gene nisu potvrdile monofiletički sastav Chromalveolatne superskupine (Bodily, 2005).

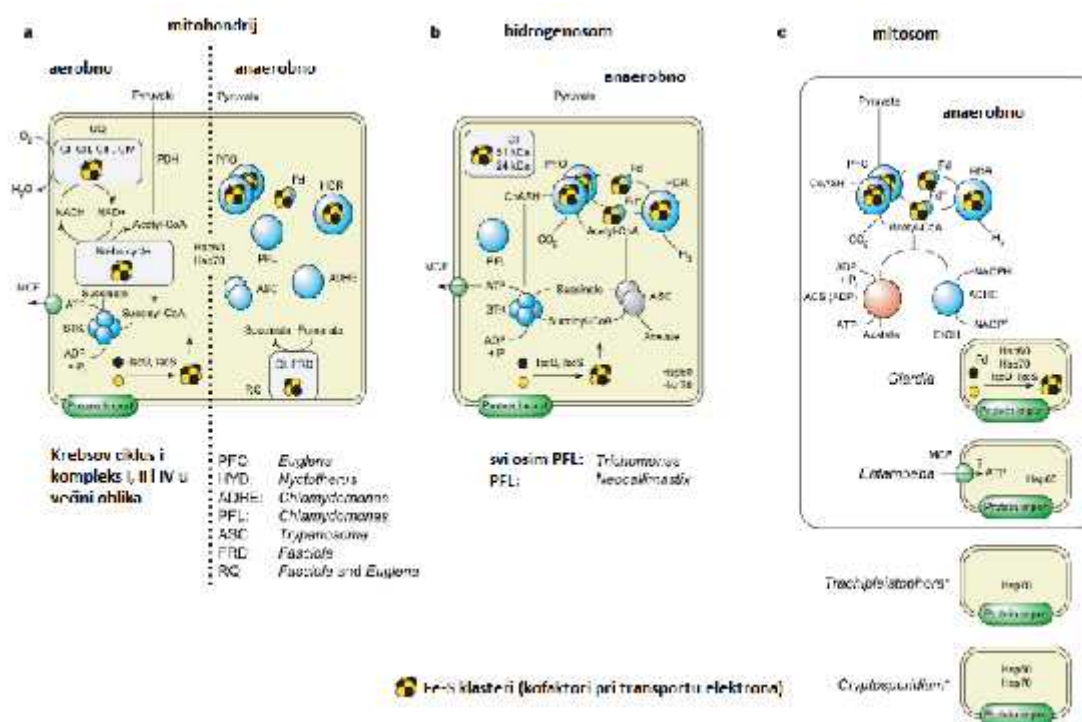


Slika 3: Chromalveolatna hipoteza (prilagođeno prema Okamoto i sur., 2009)

## 4.2. KRIPTI NI PLASTIDI I MITOHONDRIJI

U koljenu Apicomplexa pronađeni su tzv. kripti ki plastidi i mitohondriji koji su toliko degenerirani i geneti ki izmjenjeni da ih više ne možemo prepoznati i odrediti. Takve plastide mogu e je detektirati samo filogeneti kom analizom molekularnih relikta koji se skupljaju u strukture nalik organelima (Keeling i Williams, 2003). Kripti ki plastidi više ne obavljaju fotosintezu te im doma ini tada postaju sekundarni heterotrofi. Najbolje izu en kripti ki plazmid je onaj u vrste *Plasmodium falciparum* i naziva se apikoplast te služi biosintezi masnih kiselina, izoprenoida i hema (McFadden i sur., 1996).

Kripti ki mitohondriji pronađeni su u nekim parazitima me u protistima i gljivama koji su sekundarno prešli na anaerobni metabolizam (Sl. 4.).



Slika 4: Oblici kripti kih organela (prilagođeno prema Embley i Martin, 2006)

### 4.2.1. HIDROGENOSOMI

Rodovi *Trichomonas* i *Neocallimastix* sadrže kripti ki organel koji se naziva hydrogenosom. On je degenerirani oblik mitohondrija koji ne sadrži genom te služi za proizvodnju ATP. Za razliku od mitohondrija u hydrogenosomu se koristi proton umjesto kisika kao krajnji receptor elektrona pri proizvodnji ATP-a (Boxma i sur., 2005). Hydrogenosomi reduciraju piruvat u  $H_2$ ,  $CO_2$  i acetat te dobivaju ATP pomoću fosforilacije na

razini supstrata (Müller, 1993). Za razliku od većine mitohondrija hidrogenosomi sadrže PFO i Fe hidrogenazu koji ukazuju na njegovo moguće podrijetlo iz anaerobne bakterije nalik rodu *Clostridium* (John i sur., 1979).

#### **4.2.2. MITOSOMI**

Rodovi *Giardia*, *Entamoeba* i *Cryptosporidium* sadrže kriptičke mitohondrije koji se naziva mitosom. Postoje različiti prijelazni oblici između pravog mitohondrija i mitosoma, a može ih se naći i u rodu *Euglena* te nekim višestaničarima kao što su rodovi *Fasciola* i *Ascaris*. Krajnji produkti metabolizma mitosoma su sukcinat, propionat i acetat (van Hellemond i sur., 2002). Za razliku od hidrogenosoma čini se da mitosomi nemaju neku ulogu u stvaranju ATP-a jer se nalaze u parazitima ili organizmima koji sintetiziraju ATP u citosolu (Katinka i sur., 2001, Müller, 2003). Unos proteina im je sličan onom mitohondrija (Chan i sur., 2005, Dolezal i sur., 2005, Regoes i sur., 2005). Mitosomi također ne sadrže genom.

### **4.3. KOMPLEKSNI PLASTIDI OKRUŽENI S TRI MEMBRANE**

Kao što je već navedeno, plastide okružene s tri membrane sadrže rod *Euglenophyceae* i većina razreda Dinophyceae te neke alge iz razreda Chlorarachnophyta. Postoje dvije hipoteze o postanku treće membrane kompleksnih plastida. Prva tvrdi kako je to membrana eukariotskog simbionta, no vjerojatnija je druga hipoteza koja govori kako je treća membrana ustvari membrana endosomalnog mjehurića unutar kojeg se našao endosimbiont prilikom ulaska u domaćina. Prva i druga membrana plastida identične onima u primarnoj endosimbiozi. Pretpostavlja se kako su oni bili primarno okruženi s četiri membrane, ali je jedna membrana endosimbiontskog eukariota u međuvremenu degenerirala.

#### **4.3.1. KOMPLEKSNI PLASTIDI OKRUŽENI S TRI MEMBRANE U VRSTE *Euglena gracilis***

Unutar roda *Euglenophyceae* najistraženiji je plastid vrste *Euglena gracilis*. Plastid u vrste *E. gracilis* je kružna molekula DNA velika 143-175pb što znači da je približne veličine kao i plastidi iz zelenih algi, mahovina i vaskularnih biljaka, no postoji značajna razlika u anatomiji, organizaciji operona kao i kompoziciji baza. Plastidna DNA ima vrlo malo G+C parova. Ukupno je pronađeno 58 gena koji kodiraju proteine zajedno s osam ORF koji

spadaju u jedne od najmanjih polipeptidnih gena plastida autotrofa. Genom plastida u vrste *E. gracilis* za razliku od onog u plastidu vaskularnih biljaka sadrži kompleksnije introne kao što je npr. grupa III. Još jedna razlika u odnosu na plastide vaskularnih biljaka je to što plastid *E. gracilis* ima jednu RNA polimerazu PEP<sup>7</sup> i u tome je sličan plastidu u roda *Chlamydomonas*. Euglena, za razliku od većine drugih algi, sadrži proplastide koji pri izlaganju svjetlu prelaze u kloroplaste. Taj prijelaz je praćen peterostrukom povećanjem broja plazmidnog kromosoma u stanici. Navedeno upućuje na to da svaki kloroplast sadrži više kopija plazmidnog kromosoma. Kromosom plastida *E. gracilis* osjetljiv je na određene kemijske agense i fizikalne čimbenike koji mogu dovesti do bliženja<sup>8</sup> (Krajčević, 2005).

#### 4.4. KOMPLEKSNI PLASTIDI OKRUŽENI S ČETIRI MEMBRANE

Plastidi okruženi s četiri membrane nalaze se u diviziji Heterokontophyta, koljenu Cryptophyceae te razredima Haptophyceae i Chlorarachniophyta. Zadnja membrana plastida je ili membrana endocitobiotskog eukariota ili vjerojatnije membrana endosoma u kojem se endosimbiotski eukariot nalazio u stanici. Zadnja membrana može biti povezana s endoplazmatskim retikulom<sup>9</sup> i Golgijevim tjelešcem<sup>10</sup>. Sljedeća je membrana eukariotskog endosimbionta. Prve su dvije membrane membrane plastida i identične su onima kloroplasta u viših biljaka.

Nedavno je otkriveno kako pojedine skupine divizije Heterokontophyta sadrže kompleksne plastide različitog podrijetla (Boger i sur., 1993). Za pripadnike razreda Diatomophyceae poznato je da sintetiziraju nukleotide plastida u citosolu te ih naknadno unose u plastid<sup>11</sup>.

---

<sup>7</sup> umjesto dvije ili više RNA polimeraza različitog porijekla

<sup>8</sup> izbacivanja plazmida iz stanice

<sup>9</sup> npr. u skupini Heterokontophyta

<sup>10</sup> npr. u skupini Chlorarachniophyta

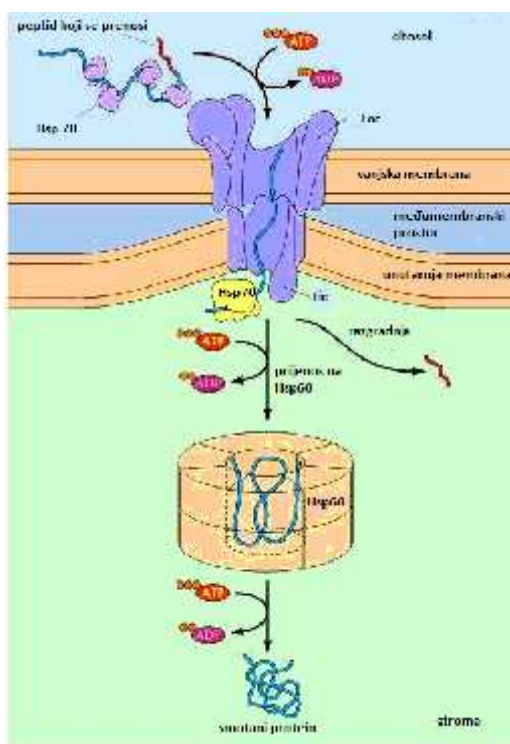
<sup>11</sup> za razliku od viših biljaka koje nukleotide namijenjene plastidu sintetiziraju u plastidu

## 5. TRANSPORT PROTEINA KROZ MEMBRANE KOMPLEKSNIH PLASTIDA

Preduvjet za uspješno uspostavljanje primarne ili sekundarne endosimbioze je razvoj povoljnih mehanizama za prepoznavanje proteina kako bi se omogućio prijenos proteina plastida kodiranih genima u jezgri preko raznovrsnih membrana plastida (Kilian i Kroth, 2003).

Svaka membrana predstavlja određenu barijeru koju protein mora proći te je stoga sortiranje proteina u kompleksnom plastidu puno kompliciranije nego kod plastida nastalih primarnom endosimbiozom. U organizmima u koje je plastid uveden primarnom endosimbiozom, multiproteinski kompleksi u membranama plastida prepoznaju i procesiraju proteine koji na N-kraju sadrže vodeću sekvencu koja je bogata serinom i treoninom (S/T).

Multiproteinski kompleks Toc nalazi se u vanjskoj dok se kompleks Tic nalazi u unutrašnjoj membrani plastida nastalih primarnom endosimbiozom (Sl. 4.). Za funkcioniranje Toc/Tic aparata potrebna je hidroliza ATP-a i GTP-a na više različitih razina. To govori da je unos proteina u plastid energetski zahtjevan proces koji zahtijeva kompleksnu i preciznu regulaciju (Jarvis i Soll, 2002).



Slika 5: Tic-Toc mehanizam u kloroplastu (prilagođeno prema Cooper, 2000)

Za unos proteina u kompleksni plastidi tako je bitno da ciljni protein sadrži sekvencu bogatu serinom i treoninom na N-kraju, no ispred nje mora se nalaziti hidrofobni signalni peptid. Takav raspored proteinskih sekvenci ukazuje na to da proteini koji su namijenjeni transportu iz citosola u plastid prolaze kroz hrapavi endoplazmatski retikulum. Međutim, takav je jednostavan model teško primijeniti na sve vrste kompleksnih plastida.

### *5.1. TRANSPORT U KOMPLEKSNE PLASTIDE OKRUŽENE S DVA MEMBRANE*

Kako su prve dvije membrane kompleksnog plastida potekle od membrana endosimbiontskog prokariota<sup>12</sup>, pretpostavlja se da sadrže Tic i Toc multiproteinske komplekse za unos proteina iz citoplazme. U slučaju treće membrane (periplastidne) koja je po podrijetlu plazmalema eukariotskog endosimbionta, mehanizmi koji služe za prijenos proteina još nisu poznati. Cavalier-Smith (1999) predložio je da postoji Toc kompleks koji je prenesen iz unutarnje membrane. Glavni nedostatak ove teorije tiče se složene biogeneze kompleksa Toc75 koji tvori transmembransku poru. Kako Toc75 sadrži kompleksni transportni peptid, za njegovu uspješnu integraciju stromalna bi peptidaza morala biti premještena u citosol endosimbionta. Takva bi translokacija bila fatalna jer bi katalizirala degradaciju tranzitnih peptida svih proteina na plastidu.

Boddy A. (2002) zato smatra da su se razvila dva neovisna translokacijska aparata u periplastidnoj membrani - jedan kanal nalik na porine u skupinama Chlorarachniophyceae i Cryptophyceae te jedan vezikularni u skupinama Heterokontophyceae i Haptophyceae.

Tako je nepoznat razvoj transportnog sustava u endosomalnoj membrani.

### *5.2. TRANSPORT U KOMPLEKSNE PLASTIDE OKRUŽENE S TRI MEMBRANE*

U kompleksnih plastida okruženih s tri membrane proteini iz citosola najprije stižu u endoplazmatski retikulum. Iz retikuluma se potom prenose u vezikule Golgijevog tjelešca te potom u plastid.

Istraživanja na plastidima skupine Dinoflagelata pokazala su da je sekvenca bogata S/T aminokiselinama okružena dvjema hidrofobnim regijama. Hidrofobna regija koja

---

<sup>12</sup> homologne su membranama nastalim primarnom endosimbiozom

prethodi S/T bogatoj sekvenci služi kao vode i polipeptid i djeluje kao tipični signalni peptid. Druga hidrofobna regija poslužila je za zaustavljanje prijenosa proteina plastida (Cappadocia i sur., 2003).

Način na koji je nastao transportni aparat još nije razjašnjen. Bodyl (2002) predlaže da je tokom sekundarne simbioze eukariotski endosimbiont iskoristio već stvoreni način transporta proteina u prvotni plastid preko Golgijevog tjelešca. To je dovelo do promjene u periplazmatskoj membrani u kojoj se stvorio novi transportni mehanizam te u plastidu koji je morao ovoj promjeni prilagoditi svoj sustav transporta proteina.

## 6. ZAKLJUČAK

Teorija o endosimbiotskom podrijetlu organela jedna je od teorija koje objašnjavaju evoluciju živih bića. Danas nam poznato kako su plastidi i mitohondriji podrijetlom prokarioti koji su prije otprilike 1,5 milijardi godina ušli u eukariotsku stanicu. Znamo da je plastid degenerirana cijanobakterija dok je mitohondrij nastao iz  $\alpha$ -proteobakterije. Također, znamo da eukariotska stanica može primiti plastid unosom drugog eukariota koji sadrži plastid posredstvom procesa znanog kao sekundarna endosimbioza. Takav kompleksni plastid možemo lako razlikovati od onoga koji je nastao primarnom endocitobiozom jer sadrži tri ili više membrana. Također, u zadnje se vrijeme spominju i tercijarne pa čak i kvartarne endosimbioze kojima se pokušava objasniti pojava višestrukih membrana oko plastida.

Unutar domaćina genom simbionta prolazi kroz period intenzivne redukcije svog materijala. Jezgra domaćina preuzima i selektira gene endosimbionta te ih po potrebi zadržava ili odbacuje. Tijekom primarne endosimbioze jezgra domaćina reducira genom slobodne cijanobakterije pretvaraju i je u semiautonomni organel. Tijekom sekundarne endosimbioze jezgra eukariotskog endosimbionta može predati sve svoje gene jezgri domaćinu ili može opstajati u obliku nukleomorfa. Ukoliko se genom plastida u potpunosti izgubi govorimo o kriptikom plastidu.

U početku se teorija o endosimbiozi cijanobakterije i eukariota temeljila na strukturnoj sličnosti bakterije i plastida. U današnje vrijeme analize se provode na molekularnoj razini. Analize genoma i transporta proteina preko membrana plastida daju jasniju sliku odnosa među vrstama koje nose plastid te nastanka plastida iz nekad samostalnih organizama.



## 7. LITERATURA

- Adams, B. J., Becnel, J. J., Boucias, D. G. i Tartar, A. (2002): Phylogenetic analysis identifies the invertebrate pathogen *Helicosporidium sp.* as a green algae (*Chlorophyta*), Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**, 273–279
- Alsmark, U. C., Andersson, J. O., Andersson, S. G. E., Eriksson, A. S., Kurland, C. G., Naslund, A. K., Podowski, R. M., Sicheritz-Ponten, T., Zomorodipour, A. i Winkler, H. H. (1998): The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature **396**, 133 - 140
- Beaton, M., Cavalier-Smith, T., Douglas, S., Fraunholz, M., Maier, U. G., Penny, S., Wastl, J. i Zauner, S. (2000): Chloroplast protein and centrosomal genes, a tRNA intron, and odd telomeres in an unusually compact eukaryotic genome, the cryptomonad nucleomorph. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 200–205
- Bodyl, A. (2002): Is Protein Import into Plastids with Four-Membrane Envelopes Dependent on Two Toc Systems Operating in Tandem?. Plant Biol. **4**, 423–431
- Bodyl, A. (2005): Do plastid-related characters support the chromalveolate hypothesis?. J. Phycol. **41**, 712-719
- Bodyl, A. i Morczynsky, K. (2006): Did the peridinin plastid evolve through tertiary endosymbiosis? A hypotesis. Eur. J. Phycol. **41**, 435-448
- Boger, P., Lechner, S. i Scherer, S. (1993): PsbD sequences of *Bumilleriopsis fliformis* (*Heterokontophyta*, *Xantophyceae*) and *Porphyridium purpureum* (*Rhodophyta*, *Bangiophycidae*): evidence for polyphyletic origins of plastids. Curr. Genet. **24**, 437-42
- van Alex, T. A., Boxma, B., Friedrich, T., Gabaldón, T., de Graaf, R. M., Hackstein, J. H. P., van Hellemond, J. J., van Hoek, A. H. A. M., Huynen, M. A., Koopman, W. J. H., Moon-van der Staay, S. Y., van der Staay, G. W. M., Ricard, G., Tielens, A. G. M. i Veenhuis, M. (2005): An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. Nature **434**, 74-79
- Cappadocia, M., Morse, D. i Nassoury, N. (2003): Plastid ultrastructure defines the protein input pathway in dinoflagellates. J. Cell Sci. **116**, 2867-2874
- Cavalier-Smith, T. (1999): Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: Euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. J. Eukaryot. Microbiol. **46**, 347-366

- Cavalier-Smith, T. (2002): The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 297–354
- Cavalier-Smith, T. (2003): Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **358**, 109–134
- Cavalier-Smith, T. (2006): Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium. *Proc. Biol. Sci.* **273**, 1943–1952
- Chan, K. W., Slotboom, D. J., Cox, S., Embley, T. M., Fabre, O., van der Giezen, M., Harding, M., Horner, D. S., Kunji, E. R., León-Avila, G., Tovar, J. (2005): A Novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite *Entamoeba histolytica*. *Curr. Biol.* **15**, 737–742
- Chapman, M., Guerrero, R., Hall, J. i Margulis, L. (2006): The last eukaryotic common ancestor (LECA): Acquisition of cytoskeletal motility from aerotolerant spirochetes in the Proterozoic Eon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 13080–13085
- Couch, J., Hauber, M. M., Hofmann, C. J., Igloi, G. L., Maier, U. G., Martin, W. F., McFadden, G. I., Muller, S. B. i Rensing, S. A. (1994): The smallest known eukaryotic genomes encode a protein gene: towards an understanding of nucleomorph functions. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 600–604
- Bursa , D., Dolezal, P., Lithgow, T., Nebesárová, J., Rada, P., Smíd, O., Suták, R., Tachezy, J. i Zubáková, Z. (2005): Giardia mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 10924–10929
- Bradley, P. J., Delgadillo-Correa, M. G., Dyall, S. D., Johnson, P. J., Koehler, C. M., Leuenberger, D., Plümper, E. i Turck, C. W. (2000): Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes: Conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2488–2497
- Embley, M. T. i Martin, W. (2006): Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* **440**, 623–630
- Eschbach, S. i Hansmann, P. (1990): Isolation and preliminary characterization of the nucleus and the nucleomorph of a cryptomonad, *Pyrenomonas salina*. *Eur. J. Cell Biol.* **52**, 373–378
- Fast, N. M., Keeling, P. J., Law, J. S. i Williams, B. A. (2003): Bacterial catalase in the microsporidian *Nosema locustae*: implications for microsporidian metabolism and genome evolution. *Eukaryot. Cell* **2**, 1069–1075

- Gardner, M. J. i sur. (1998): Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Science **282**, 1126–1132
- Dyal, P. L., Embley, T. M., van der Giezen, M., Harding, M., Horner, D. S., Kunji, E. R. S., Slotboom, D.J. i Xue, G.-P. (2002): Conserved properties of hydrogenosomal and mitochondrial ADP/ATP carriers: A common origin for both organelles. EMBO J. **21**, 572–579
- Gilson, P. R. i McFadden, G. I. (1996): The miniaturized nuclear genome of a eukaryotic endosymbiont contains genes that overlap, genes that are cotranscribed, and the smallest known spliceosomal introns, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 7737-7742
- van Hellemond, J. J., Martin, W., Rotte, C. i Tielens, A. G. (2002): Mitochondria as we don't know them. Trends Biochem. Sci. **27**, 564-572
- Bardonová, L., Dolezal, P., Embley, T. M., Foster, P. G., Hirt, R. P., Hrdy, I. i Tachezy, J. (2004): *Trichomonas hydrogenosomes* contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. Nature **432**, 618–622
- Ishida, K., Yabuki, A. i Ota, S. (2007): The chlorarachniophytes: evolution and classification. U: Brodie, J. i Lewis, J. (ur.) Unravelling the Algae: The Past, Present, and Future of Algal Systematics, Boca Raton, FL: CRC Press, pp 171–182
- Jarvis, P. i Soll, J. (2002): Toc, Tic, and chloroplast protein import. Biochim Biophys Acta. **1590**, 177-189
- Jeffrey, S. W. i Vesk, M. (1976): Further evidence for a membrane-bound endosymbiont within the dinoflagellate *Peridinium foliaceum*, J. Phycol. **12**, 450-455
- John, P., Whatley, J. M. i Whatley, F. R. (1979): From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. Proc. R. Soc. Lond. B. **204**, 165-187
- El Alaoui, H., Barbe, V., Brottier, P., Cornillot, E., Delbac, F., Duprat, S., Gouy, M., Katinka, M. D., Méténier, G., Peyret, P., Peyretailade, E., Prensier, G., Saurin, W., Thomarat, F., Thomarat, F., Weissenbach, J. i Wincker, P. (2001): Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. Nature **414**, 450–453
- Patrick J. Keeling (2004): Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. Am. J. Bot. **91**, 1481-1493
- Kilian, O. i Kroth, P. G. (2003): Evolution of protein targeting into complex plastids: The secretory transport hypothesis. Plant Biol. **5**, 350-358
- Kraj ovi , J. (2005): Plastids as drug targets. U: Berger, J. (uz.) Advances in cell and molecular biology, Kopp. Pub., 172

- Lill, R. & Muhlenhoff, U. (2005): Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 133–141
- Ludwig, M. i Gibbs, S. P. (1985): DNA is present in the nucleomorph of cryptomonads: further evidence that the chloroplast evolved from a eukaryotic endosymbiont. *Protoplasma* **127**, 9-20.
- Martin, W. i Schnarrenberger, C. (2002): Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene transfer. *Eur. J. Biochem.* **269**, 868–883
- Maier, U. G., Rensing, S. A., Van de Peer, Y. i de Wachter, R. (1996): Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7732-7736
- Morse, D. i Nassoury, N. (2005): Protein targeting to the chloroplasts of photosintetic eukariotes: getting there is half the fun. *BBA* **1743**, 5-19
- Müller, M. (2003): Energy metabolism. Part I: anaerobic protozoa. U: Marr, J. (ur.) *Molecular Medical Parasitology*, Academic, London, pp 125–139
- Müller, M. (1993): The hydrogenosome. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 2879–2889
- Okamoto, N., Chantangsi, C., Horák, A., Leander, B. S. i Keeling, P. J. (2009): Molecular Phylogeny and Description of the Novel Katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and Establishment of the Hacrobia Taxon nov.. *PLoS ONE* 4(9)
- Regoes, A., Zourmpanou, D., León-Avila, G., van der Giezen, M., Tovar, J. i Hehl, A. B. (2005): Protein import, replication and inheritance of a vestigial mitochondrion. *J. Biol. Chem.* **280**, 30557–30563
- Rizzotti, M. (2000): Early Evolution: From the Appearance of the First Cell to the First Modern Organisms, Birkhäuser Verlag, pp 122-133
- Dancis, A. Delgadillo-Correa, M., Dolezal, P., Johnson, P. J., Fiumera, H. L., Hrdy, I., Müller, M., Sutak, R. i Tachezy, J. (2004): Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 10368-10373
- Boxma, B., Hackstein, J. H., Haferkamp, I., Huynen, M., Tielens, A. G. i Tjaden, J. (2004): A divergent ADP/ATP carrier in the hydrogenosomes of *Trichomonas gallinae* argues for an independent origin of these organelles. *Mol. Microbiol.* **51**, 1439–1446
- León-Avila, G., Lucocq, J. M., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., Sánchez, L. B., Sutak, R. i Tachezy, J. (2003): Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron–sulphur protein maturation. *Nature* **426**, 172–176

Wernegreen, J. J. (2005): For better or worse: genomic consequences of intracellular mutualism and parasitism, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**, 572-583

[wikispaces.psu.edu/display/110Master/Protists+I+-](http://wikispaces.psu.edu/display/110Master/Protists+I+-)

[+Kingdoms+Archaezoa,+Euglenozoa,+Alveolata,+and+Slime+Molds](#)

[www.encyclo.co.uk/define/Cabozoa](http://www.encyclo.co.uk/define/Cabozoa)

[www.ucmp.berkeley.edu/chromista/chromistasy.html](http://www.ucmp.berkeley.edu/chromista/chromistasy.html)

## 8. POPIS KRATICA

ATP = adenozin tri-fosfat

GTP = gvanozin tri-fosfat

NUPT = nuclear plastid (*jezgrin i plastidni*<sup>13</sup>)

ORF = open reading frame (otvoreni okvir itanja)

PEP = plastid – encoded plastid (*plastidni kodiran plastidnim genima*)

PFO = piruvat : feredoksin oksidoreduktaza

rRNA = ribosomska RNA

Tic = translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts (*prijenosni kanal na unutrašnjoj membrani plastida*)

Toc = translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts (*prijenosni kanal na vanjskoj membrani plastida*)

---

<sup>13</sup> tekst u kurzivu u zagradi je slobodan prijevod

## 9. SAŽETAK

Endosimbiontska teorija o porijeklu plastida stara je više od sto godina i danas je prihvaćena kao jedina važna teorija o postanku organela. Danas se pretpostavlja kako su mitohondriji podrijetlom  $\alpha$ -protoplaste dok se pretkom plastida smatra cijanobakterija. Primarna endosimbioza spojila je endosimbiontsku bakteriju i njenog domaćina eukariota. Jednosmjernim transferom gena iz cijanobakterije u jezgru domaćina bakterija je s vremenom postala plastid. Sljedeći događaj koji je mogao je nastupiti sekundarna endosimbioza u kojoj je alga s cijanobakterijskim plastidom ušla u vezu u heterotrofnu stanicu. Tada je došlo do redukcije genetskog materijala endosimbionta te nastanka nukleomorfa. Ukoliko je transfer gena koji je nastupio bio potpun, ostao je samo plastid okružen s tri ili četiri membrane koji se naziva kompleksnim plastidom. Može doći i do potpune degeneracije organela koji postaje neprepoznatljiv te ga tada nazivamo kriptičkim organelom. Osim transfera gena, drugi najvažniji mehanizam pri nastanku organela je organizacija transporta proteina preko novonastalih membrana.

Ovaj rad se bavi karakteristikama organela nastalih sekundarnom endosimbiozom kao i nekim teorijama koje objašnjavaju njihov postanak.

## 10. SUMMARY

Endosymbiotic theory on the origin of plastids is over one hundred years old and today is accepted as the only valid theory on the origin of organelles. Today, it is assumed that mitochondria originated from  $\alpha$ -proteobacteria and cyanobacteria are considered to be plastid ancestors. Primary endosymbiosis merged the endosymbiotic bacterium and its host eukaryote. One-way transfer of genes from cyanobacteria into the host nucleus eventually turned bacteria into a plastid. The next probable event was a secondary endosymbiosis in which the algae with cyanobacterial plastids entered the larger heterotrophic cell. The reduction of endosymbiont's genetic material occurred and induced the creation of nucleomorph. If a total transfer of genes occurred, only a plastid surrounded by three or four membranes – a complex plastid- remained, and then we call them complex plastids. A complete degeneration of organelles can also occur, organelle becomes unrecognizable and we name it cryptic organelle. In addition to gene transfer, the second most important mechanism in organelle formation is organization of protein transfer through the newly formed membranes.

This seminar covers characteristics of organelles created as a product of secondary endosymbiotic event and some theories explaining their origin.